

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-210925

(43) 公開日 平成4年(1992)8月3日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/00	G	8413-4 C		
9/00	H	7329-4 C		
9/127	L	7329-4 C		
	T	7329-4 C		
	F	7329-4 C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-26675	(71) 出願人	591024591 デュファル インテルナショナル レセー ルフ ベスローテン フェンノートシャツ プ DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH BESLOTEN V ENNOOTSHAP オランダ国 ウエースプ セー イエー ファン ホウテンラーン 36
(22) 出願日	平成3年(1991)1月29日	(72) 発明者	アールゼン デ ハーン オランダ国ウエースプ セー イエー フ アン ホウテンラーン36
(31) 優先権主張番号	9 0 0 0 2 0 7	(74) 代理人	弁理士 杉村 暁秀 (外5名) 最終頁に続く
(32) 優先日	1990年1月29日		
(33) 優先権主張国	オランダ (NL)		

(54) 【発明の名称】 鼻腔内または吸入投与用ワクチン製剤およびその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 インフルエンザ感染を予防する鼻腔内または吸入投与用のリボソーム含有ワクチン製剤およびそれを製造する。

【構成】 鼻腔内または吸入インフルエンザ サブユニット ワクチン製剤がエンブティ リボソームと自由に混合した抗原材料を含み、リボソームの存在がリボソームを含まないサブユニット ワクチンによる i.m. 免疫感作に関して循環において I g G 応答を刺激すると共に、呼吸路において局部 I g A 応答を発生する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エンプティ リポソームと自由に混合する抗原材料を含む鼻腔内または吸入投与用ワクチン製剤。

【請求項2】 抗原材料としてインフルエンザ ウイルスの表面抗原を含む請求項1記載のワクチン製剤。

【請求項3】 抗原材料が異なる抗原の組換え体からなる請求項1記載のワクチン製剤。

【請求項4】 リポソーム材料対抗原材料の質量比を少なくとも5とした請求項1～3のいずれか一つの項記載のワクチン製剤。

【請求項5】 リポソームが実効負表面荷電を与える成分を含む請求項1～4のいずれか一つの項記載のワクチン製剤。

【請求項6】 リポソームは1または2種以上のりん脂質、必要に応じてステロールを含む請求項1～5のいずれか一つの項記載のワクチン製剤。

【請求項7】 ホスファチジルコリンをりん脂質として用いた請求項6記載のワクチン製剤。

【請求項8】 コレステロールをステロールとして用いた請求項6記載のワクチン製剤。

【請求項9】 ジセチルホスフェート、ホスファチジン酸またはホスファチジルグリセロールを電荷決定成分として存在させた請求項5記載のワクチン製剤。

【請求項10】 乾燥脂質を水性媒質に分散し、生成するリポソーム含有混合物を抗原含有溶液と混合することを特徴とする請求項1～9のいずれか一つの項記載のワクチン製剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】 本発明は鼻腔内または吸入投与用のリポソーム含有ワクチン製剤およびその製造に関する。特に、本発明は人のインフルエンザ感染を防止する上記タイプのワクチンに関する。しかしながら、本発明はインフルエンザ ワクチンの適用に制限するものでない。

【0002】

【背景技術】 感染患者に対する予防接種は、特別の病原体から誘導した抗原製剤の導入により感染剤 (infectious agent) に対する免疫応答を刺激することによって、予防接種者の感染を予防または少なくとも抑制している。實際上、誘導免疫応答は2成分、すなわち、体液応答 (抗体-特異的抗体の生成) および細胞応答 (病原体により感染した細胞を除去できる特異的細胞障害性Tリンパ球の発生) からなる。

【0003】 多くの予防接種手順は不活化および弱毒化全病原体を含有する製剤を投与することを含んでいる。しかしながら、この製剤は通常、著しく免疫原性であっても、望ましくない副作用を有することから、全病原体での予防接種には無視できない欠点がある。この事は、全感染剤の有害な副作用が実質的に乏しいよく規定され

たサブユニットまたは合成ワクチンの使用に向ける最近の傾向を説明している。しかしながら、全病原体と比べて、サブユニットまたは合成ワクチンは少なくとも付加補助剤の不存在において、しばしば極めて免疫原性でない。補助剤は抗原と共に投与する物質または材料であり、抗原に対する免疫応答を刺激する。この場合、望ましくない副作用を生じないサブユニットまたは合成抗原に対する免疫応答を高める適当な補助剤についての必要性がある。

【0004】 インフルエンザ ワクチン製剤は長時間にわたって含み、ある場合には、なお不活化または弱毒化全ウイルスを含んでいる。この製剤は注射部位において著しく発熱および反応する無視できない副作用を有している。現今では、予防接種は、通常、サブユニット製剤で行われている。副作用の少ないこのサブユニットワクチンはウイルスの2種の主な表面抗原、すなわち、幾分精製された形態の赤血球凝集素 (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) を含んでいる。もっとも最近のワクチン製剤においては付加補助剤を加えていない。

【0005】 不活化または弱毒化全インフルエンザ ウイルス ワクチンおよびサブユニット ワクチンは通常、単筋肉内 (single intramuscular) (i.m.) 注射によって投与している。いずれかの予防接種手順により達成されたインフルエンザ感染に対する予防は、特に年輩者において比較的に低い。インフルエンザに対する予防接種の比較的に低い効率はウイルスの高い抗原変異性によるものである。しかしながら、この場合、予防接種によるインフルエンザ感染に対する予防はワクチンに対する免疫応答の刺激および変化 (modification) によって改善することができる。

【0006】 インフルエンザの場合、または一般に感染を呼吸路 (respiratory tract) を介して抑制する場合に、改良された予防接種効率についての計画は循環における適当なT細胞-依存IgG応答の発生のみならず、侵される感染ウイルスに対する防衛の第一線として肺および鼻腔における局部免疫応答 (分泌IgA) の発生に向ける必要がある。更に、細胞免疫応答 (細胞障害性T細胞) は、特に感染を抑制するのに大切である。i.m. 注射 (投与の経路) によるインフルエンザワクチンの投与は呼吸経路における局所IgA応答が得られないことが確められている。

【0007】

【発明の開示】 本発明は、鼻腔内または吸入インフルエンザ サブユニット ワクチン製剤におけるリポソームの存在が、遊離サブユニット ワクチン (free subunit vaccine) による i.m. 免疫感作に関して循環においてIgG応答を刺激すると共に、呼吸路において局所IgA応答を発生することを確めた。

【0008】 リポソームは生体膜 (biological membrane) についてのモデルとして、および薬物および他の生

物学的活性物質についての潜在的キャリアー系として広範囲にわたって研究されている。リポソームは単一りん脂質またはステロール、例えばコレステロールと組合わせたまたは組合わせない種々のりん脂質の混合物から出発する種々の手段で作ることができる。方法学の適当な選択によって、単ラメラ、オリゴラメラまたは多ラメラ小胞の比較的均質な組成物を作ることができ、小胞の直径はある制限内で変えることができる。各タイプのリポソームは1つまたは2つ以上の同心膜により外部媒質から分離した1または2個以上の区分を有しており、各膜は脂質二重層を含んでいる。水溶性物質はこれらの内部区分内に封入することができる。

【0009】リポソームの補助剤作用についての根本原理は知られていない。しかしながら、ワクチン製剤におけるリポソームは抗原キャリアーの機能に役立つことは広く認められている。それ故、リポソームの補助剤作用は、体におけるリポソームの細網内皮系（RES）に属する細胞、特に肝臓、脾臓、骨髄および肺におけるマクロファージに属する細胞への自然標的によるものと思われる。マクロファージは抗原提示細胞（APC's）として免疫応答における主要役割を演ずることは知られている。最適な抗原提示は、このタイプの免疫応答に臨界的に含まれているヘルパーT細胞が抗原との相互作用によって、またAPC'sの表面において発現した抗原によって活性化しないから、有効T細胞依存体液性免疫応答の発生に重要である。

【0010】リポソームの補助剤活性はリポソームの封入によってワクチン製剤、特にインフルエンザ ワクチン製剤を改良する多くの試みを提起する。例外なく、これらの製剤において、抗原はリポソームの水性内部に封入することによって、またはリポソームの外面に結合することによってリポソームと物理的に結合する。例えば欧州特許出願第89402344、9号（公開第0356340号）明細書には抗原がリポソームの表面と親和的に結合するワクチン製剤について記載されている。これらの従来のリポソーム ワクチン製剤が、リポソームの抗原-キャリアー機能が抗原とキャリアーとのある種の結合を明らかに要求することから、抗原-リポソーム複合体の発生に基づくことは驚くべきことでない。本発明におけるワクチン製剤は抗原とリポソームの結合を含んでいない。これに対して、製剤はリポソームおよび非封入（non-enclosed）抗原材料を含んでいる。かかるワクチンによって、リポソームの不存在における抗原によるより相当に高い免疫応答が得られることは、極めて驚くべきことである（例1および2）。更に、リポソームによる免疫応答の刺激は、リポソームおよび抗原を時間間隔において別々に投与する場合（例3）に得られることは、また驚くべきことである。この事は、この場合にリポソームの刺激効果が抗原キャリアーとしてリポソームの推定機能によらないことを暗示している。リポソ

ームおよび抗原が互いに結合することについて注意を払う必要がないことは、本発明による製剤についての大きい利点である。

【0011】上述する既知のリポソーム ワクチン製剤の効率については、通常、動物、一般にマウスに筋肉内、皮下または腹腔内投与後に試験されている。これに対して、本発明におけるワクチン製剤は鼻腔内的にまたは吸入的に投与し、呼吸路において有意な局部IgA応答を誘導することができる。1例においては、リポソーム インフルエンザ ワクチン製剤は鼻腔内的に投与されている（トルチリン氏ら「薬物キャリアーとしてのリポソーム（Liposomes as Drug Carriers）」ページ229～230（1988）、G. グリコリアデマ氏（編集者）、John Wiley & Sons, Ltd.）。しかしながら、この特定製剤においては、抗原をリポソームの水性区分内に封入しているのに対して、本発明によるワクチン製剤においては抗原およびリポソームを自由に混合している。トルチリン氏の上記文献に記載されているワクチン製剤は呼吸路におけるIgA生成について試験されていない。

【0012】本発明におけるワクチンの投与の経路は、インフルエンザのような、通常、生命の危険（life-threatening）に直面しない患者に対する予防接種に特に有利である。これらの場合において、しばしば予防接種を便宜さの問題について考察する場合において、筋肉内注射の不便さは予防接種の効果的な実施において極めて障害になる。

【0013】1例として、本発明を主としてインフルエンザ ウイルス サブユニット抗原について説明する。しかしながら、例5および例6は、本発明がインフルエンザワクチン製剤に制限しないことを示している。また、リポソームは他の抗原と、または異なる抗原の混合物と混合することができる。

【0014】リポソームの刺激効果は、リポソーム材料対抗原材料の質量比が少なくとも5である場合に有意であることを確め、最適比は100～1000程度に高めることができる。

【0015】本発明において用いるリポソームは1または2種以上のりん脂質、例えばホスファチジルコリン（PC）、必要に応じてステロール、例えばコレステロールから作るのが好ましい。更に、リポソームには実効負表面荷電を与える成分を含めることが重要であることを確めた。この目的のために適当な成分としては、例えばジセチルホスフェート（DCP）、ホスファチジン酸（PA）またはホスファチジルグリセロール（PG）を挙げることができる。

【0016】本発明のワクチンにおけるリポソームは多ラメラタイプが好ましい。このリポソームは乾燥脂質混合物をりん酸緩衝溶液（PBS）のような緩衝塩溶液に分散することによる簡単な手段で作ることができる。必

要に応じて、生成したリポソームを、例えばポリカーボネート ユニポーラ フィルター (unipore filter) を介して押出してリポソームの大きさに極めて均質に分布することができる。

【0017】

【実施例】次に、本発明のワクチンの調製および使用を例に基づいて説明する。

#### 例 1

5匹のマウス (Balb / C) グループを遊離抗原 (free antigen) (グループA) またはエンブティ リポソーム (empty liposomes) と混合した遊離抗原 (グループBおよびC) で鼻腔的に免疫にした (全量 50  $\mu$ l を僅かなエーテル麻酔状態で投与した)。抗原としてはインフルエンザ ウイルス 菌株X-97 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> タイプの組換え体インフルエンザ 菌株) から既知の方法によって作ったインフルエンザ ウイルス サブユニット ワクチンを用いた。リポソームにはコレステロール (Chol), 卵黄ホスファチジルコリン (PC) および負帯電脂質を含ませた。この試験において、2種の異なる負帯電脂質、すなわち、ジセチルホスフェート (DCP) およびホスファチジルグリセロール (PG) と比べた。免疫感作の投与はマウス当り 1  $\mu$ g の抗原 (単純放射拡散分析により定めたサブユニット生成物の赤血球凝集素 (HIA) に基づく) および 1.6  $\mu$ mol のリポソームりん脂質とし、2回の免疫感作を0日および4日目に行った。

【0018】グループBおよびCにおいて、2種の異なる組成物のリポソームを用いた：

(B) : Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比)

(C) : Chol / PC / PG = 5 / 4 / 1 (モル比)

血清試料は第1図に示す時間で採取し、抗原-特異的 I g G の力価を既知の酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) で評価した。

【0019】遊離抗原による免疫感作では比較的到低い抗原-特異的血清 I g G 力価を得た (第1図)。ウイルス抗原をいずれかのタイプのエンブティ リポソームと混合することによって、I g G 応答に強い刺激効果を得た。第1図はインフルエンザサブユニット抗原 (グループA) で、およびリポソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で i.n. 免疫感作後のマウスにおける抗原-特異的血清 I g G の力価を示している。

【0020】

#### 例 2

5匹のマウス (Balb / C) グループを例1に記載すると同様にして鼻腔的に免疫にした。肺洗浄液 (lung washings) を第1免疫感作後 33 日目に採取し (5匹のマウスからのPBSにおける洗浄液をプールし、最終容量 1.0 ml に濃縮した)、およびELISAによって抗

原-特異的 I g A を評価した。

【0021】有意な I g A 力価をいずれかの組成のエンブティ リポソームと混合した抗体で免疫にしたマウスから誘導した洗浄液について測定した (第2図)。極めて低い力価を遊離抗体で免疫にしたマウスから誘導した洗浄液において測定した。第2図はインフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) およびリポソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で i.n. 免疫感作後、33日目にマウスから得た肺洗浄液における抗原-特異的局所 I g A 力価を示している。

【0022】

#### 例 3

5匹のマウス (Balb / C) グループを、DCP含有リポソームを用いおよび単純 (single) 免疫感作を与えるという条件で、例1に記載するようにして鼻腔的に免疫にした。マウス グループを遊離抗原のみ (グループA) で、またリポソームと混合した抗原 (グループB) で免疫感作するほかに、マウス グループ (C) にはリポソームと抗原とを時間間隔を置いて別々に与え、この場合、最初にリポソームを与え、リポソームの投与後24時間して抗原を与えた。肺洗浄液における血清 I g G および I g A をそれぞれ例1および2に記載するように33日目に評価した。

【0023】遊離抗原のみの場合では、検出する血清 I g G または局所 I g A 応答が誘発しなかった (第3図)。リポソームと混合した抗原の場合では、肺において抗原-特異的血清 I g G および局所 I g A の高い力価を生じた。リポソームおよび抗原を別々に投与した場合でも、同様の結果が得られたことは有意なことである。第3図は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) または Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比) のリポソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で、および最初にリポソームを与え、その後24時間して抗原を与え (グループD) で単純 i.n. 免疫感作した後、33日目にマウスの抗原-特異的血清 I g G および肺 I g A 力価を示している。

【0024】

#### 例 4

16匹のマウス (Balb / C) グループを、遊離抗原の1回投与 (グループA) で筋肉内に、またリポソームと混合した抗原 (Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1) の1回投与 (グループB) または2回投与 (グループC) (0日および4日目) で鼻腔的に免疫にした。対照グループ (D) には抗原を与えなかった。抗原としては投与当り 5  $\mu$ g HA でインフルエンザ ウイルス 菌株X-83 (菌株A / Chile, H1N1 のHAを担持する組換え体) から作ったサブユニット ワクチンを用いた。免疫感作後35日目に、マウスを感染インフルエンザ A / クリスト (Christ) / 157 / M<sub>30</sub> M<sub>1</sub> E<sub>4</sub> で鼻腔的に攻撃した。攻撃後7日生き残ったマウスを記録した。

【0025】結果を表Iに示し、リボソーム鼻腔内ワクチン製剤が筋肉内的に投与した遊離サブユニット ワクチンと少なくとも同等の感染に対する予防効果のあることを示している。2種の製剤による単一免疫感作では \*

\*ポソーム i.n. ワクチンの場合に僅かによい生存率を示し、および0日および4日目における i.n. 製剤による二重免疫感作では 100%の生存率を与えた。

表 I

グループ	生存率 (%)
A	81.3 (13/16)
B	93.8 (15/16)
C	100.0 (16/16)
D	50.0 (8/16) *

\*) 生存するマウスは7日後ひどく体調が悪くなり、回収する見込がなかった。

## 【0026】

## 例 5

5匹のマウス (Balb /C) グループをはしか抗原で、DCP含有リボソームだけを用いるという条件で、例1 20に記載するように鼻腔内に免疫にした。抗原としては不活化はしかウイルスを含む製剤を用いた。マウスを遊離抗原のみ (グループA) で、またはリボソームと混合した抗原 (グループB) で免疫にした。肺洗浄液中の血清 IgGおよびIgAをELISAで評価した。

【0027】遊離抗原のみの場合には有意な血清 IgG 応答を生じたが、しかしながら、応答はワクチンにリボソームを存在することによって実質的に増大した (第4図)。この場合、遊離抗原のみによる免疫感作後、肺における局所 IgA 応答は検知できなかった。リボソーム 30と混合した抗原の場合には、抗原-特異的 IgA の高い力価が生じた。第4図は、はしか抗原 (グループA) で、または Chol /PC/DCP=5/4/1 (モル比) のリボソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で、i.n. 免疫感作した後のマウスの抗原-特異的血清 IgGおよび肺 IgA 力価を示しており、この場合抗原は0日または4日目に2回投与した。

【図面の簡単な説明】

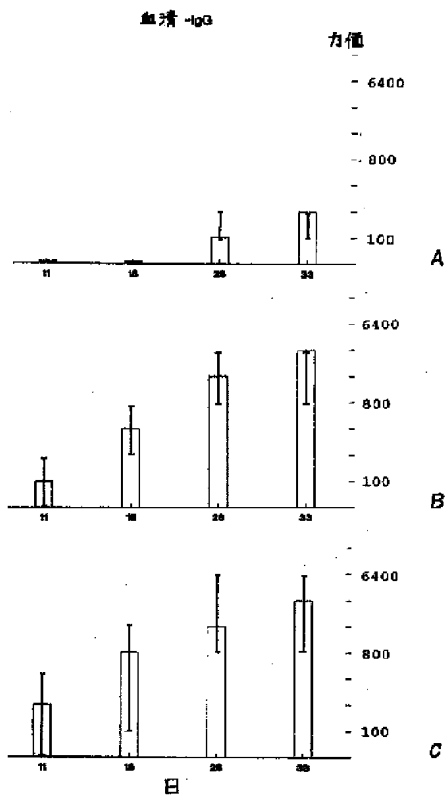
【図1】図1は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) で、およびリボソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で i.n. 免疫感作後のマウスにおける抗原-特異的血清 IgG 力価を示すグラフである。

【図2】図2は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) およびリボソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で i.n. 免疫感作後、33日目にマウスから得た肺洗浄液における抗原-特異的局所 IgA 力価を示すグラフである。

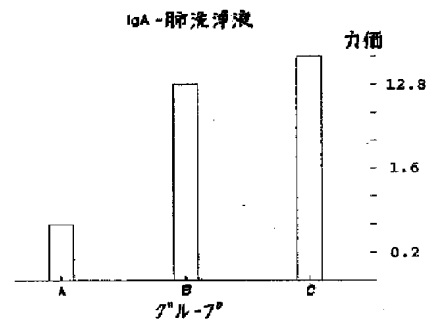
【図3】図3は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) または Chol /PC/DCP=5/4/1 (モル比) のリボソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で、および最初にリボソームを与え、その後24時間して抗原を与え (グループD) で単純 i.n. 免疫感作した後、33日目におけるマウスの抗原-特異的血清 IgGおよび肺 IgA 力価を示すグラフである。

【図4】図4は、はしか抗原 (グループA) で、または Chol /PC/DCP=5/4/1 (モル比) のリボソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で、i.n. 免疫感作した後のマウスの抗原-特異的血清 IgGおよび肺 IgA 力価を示すグラフで、抗原は0日または4日目に2回投与した。

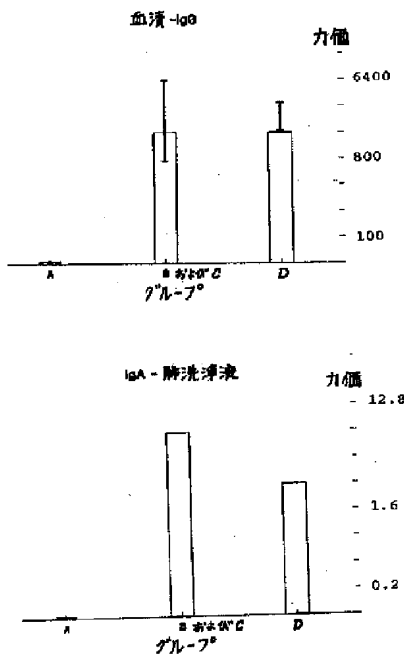
【図1】



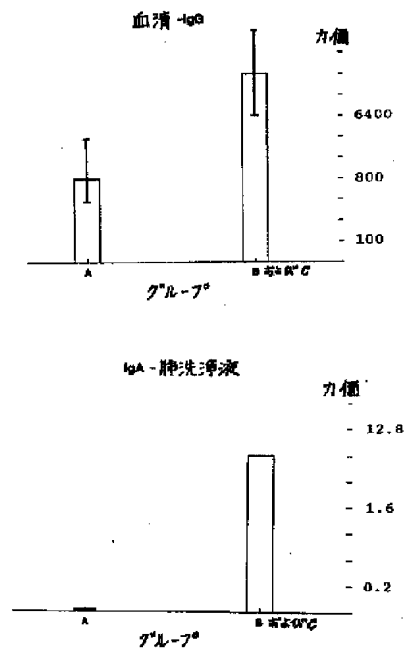
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/145		8413-4C		
39/165		8413-4C		
(72)発明者 ハルメン ヤコブ ヘルリングス オランダ国ウエースプ セー イエー フ アン ホウテンラーン36			(72)発明者 ヤン クリスチヤン ウイルスフト オランダ国ウエースプ セー イエー フ アン ホウテンラーン36	